

Emlősök korai embrionális génjei kifejeződésének vizsgálata molekuláris biológiai módszerekkel

Doktori értekezés tézisei

Baji Gál Árpád

Biológia Doktori Iskola, iskolavezető: Prof. Erdei Anna

Szerkezeti biokémia program, programvezető: Prof. Gráf László

Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar



Témavezető: Dr. Dinnyés András

MTA doktora, kutatócsoport vezető

Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont, Gödöllő

Genetikai Újraprogramozás Csoport



Gödöllő, 2008. május

Bevezetés

A fejlődésbiológiai kutatások elsődleges célja sok év óta az emlősök egyedfejlődése során zajló sejt-folyamatok molekuláris mechanizmusainak megértése. Napjainkban jutott oda a tudomány, hogy a hagyományos genetikai és embriológiai kísérleti módszerek repertoárját kiegészítsék a molekuláris és sejtbiológiai megközelítésekkel. Ennek eredményeképpen a mai modern fejlődésbiológia több más tudományág, mint a biokémia, genomika és rendszerbiológia határterületén valósul meg.

Ma már elfogadható mennyiségű bizonyíték áll rendelkezésre arról, hogy a DNS szekvencián kívül is öröklődik információ generációkon át és befolyásolhatja az utódok fenotípusát. Ezt epigenetikai információnak hívják és molekuláris alapjainak felfedezése a kutatók érdeklődésének középpontjában áll. A kromatin alapegysége a nukleoszóma, 146 bázispárnyi DNS-t tartalmaz, mely két körben tekeredik fel egy magot alkotó, 2-2 darab H2A, H2B, H3 és H4 hiszton fehérjéből álló oktamerre. A magasabb fokon rendeződött kromatin szerkezet szoros összefüggésben áll a nukleoszóma magját alkotó hiszton fehérjék kinyúló N-terminálisának, ritkábban C-terminálisának kovalens, transláció utáni módosításaival. A kromatin szerkezet dinamikus átmeneteit a kapcsolódó nem-hiszton típusú kromoszómális fehérjék biztosítják. Közülük kiemelkedő fontosságúak a „hiszton kódot” előállító és azt leolvasó fehérjék, mint például a hiszton acetil-transzferáz (HAT) és a hiszton-deacetiláz (HDAC) enzimek, melyek közösen együttműködve határozzák meg az általános genom szintű hiszton acetiláltsági állapotot, és ennél fogva a transzkripció állapotok közötti központi kapcsolóként működnek.

Az emlősök egyedfejlődésének kezdetén számos kulcsfontosságú molekuláris esemény jól szervezetten megy végbe a preimplantációs embrióban, többek között az embrionális genom aktiváció (EGA) és az első sejt differenciálódás. A háttérben a két ivarsejt genetikai információja és annak leolvasása, epigenetikai szabályozása, mint a DNS metiláció, a genomi imprinting, vagy a kromatin szerkezet átrendeződése és a hiszton fehérjék módosításai állnak, melyek a génexpresszió szabályozásán keresztül alakítják ki az embriók fejlődési programját.

A modern embrió technológiai módszerek során a megtermékenyítés és természetes folyamatok helyett mesterséges beavatkozással sikerül beindítani az embrió fejlődését és a genom epigenetikai újraprogramozódását. A génexpresszió molekuláris szintű vizsgálata és jellemzése különböző módon előállított (*in vitro* tenyésztett, mélyhűtött, parthenogenetikusan aktivált, klónozott) „mesterséges” embriókban segíteni fog életképességüknek, valamint a módszerek hatékonyságának javításában, a klónozási problémák megoldásában, a rendellenes egyedfejlődés okainak feltárásában, betegségek alapokainak tisztázásában, és új gyakorlati alkalmazásokban (szaporásbiológia, sejterápiák, regeneráló gyógyítás, gyógyszerkutatás és fejlesztés) való felhasználásukban, melyek összességében a mai modern biotechnológiai kutatásokat is szolgálják.

A különböző molekuláris biológiai vizsgálómódszerek közül jelenleg a reverz transzkripcióval kombinált real-time polimeráz láncreakciót (qRT-PCR) alkalmazzák általánosan, mely az mRNS mennyiségi meghatározásával, az adatok megfelelő elemzésével és a nyilvánvaló követelményekkel együtt alkalmas az egyedfejlődést irányító génexpresszió vizsgálatára az orvostudományban, diagnosztikában, a mikrobiológiában és a biotechnológiában.

Célkitűzések

A gödöllői Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont Genetikai Újraprogramozás Csoportjának elsődleges célja Magyarországon meghonosítani, továbbfejleszteni és optimalizálni a különböző embrió technológiákat emlőszállatokon, mint az *in vitro* embrió előállítás, parthenogenetikus aktiválást, mélyhűtést, embrionális összejt tenyésztést és a testi sejtes sejtmagátültetést (klónozást). A kutatások előrehaladását jelentősen segítené, ha az egyedfejlődésben, az embrionális genom aktiváció során, az epigenetikai újraprogramozásban, a pluripotencia kialakításában szerepet játszó gének működése vizsgálható lenne. Az értekezésben leírt kísérletek ezeket a célokat támogatták molekuláris biológiai megközelítésben.

Céljaim között szerepeltek a következő vizsgálatok.

- (1) Egy olyan új érzékeny módszer kifejlesztése, mellyel a sejtek, embriók génexpressziós aktivitását egyedi szinten vizsgálni tudom, és nem csak csoportátlagokat, hanem a csoporton belül az egyedek közti eltéréseket, a csoport homogenitását is értékelni lehet. Kétféle (végpont és real-time) RT-PCR módszer összehasonlítására vállalkoztam, majd egy teljes protokoll kifejlesztésére és jellemzésére. Az ellenőrzésére négy-nyolcsejtű egér embriók egyedi blasztomer sejtjeiben vizsgáltam a génexpressziót.
- (2) Az EGA előtti és utáni egér embrióknak a mélyhűtésre és az azt követő felmelegítésre, mint stresszre adott válaszában összehasonlítása két különböző embrió mélyhűtési módszer alkalmazása során (gyors fagyasztás szilárd felületen (SSV) és műszalmában (ISV)).
- (3) Az *in vitro* tenyésztési körülmények és a parthenogenetikus aktiválás hatásának vizsgálata az egyedfejlődésre egér embriókban több háztartási gén expressziójának meghatározásával és ezek alapján megfelelő referencia gének kiválasztása.
- (4) Alkalmos referencia gének kiválasztása *in vivo* és *in vitro* előállított nyúl embriókban, valamint két, a nyúlban eddig le nem írt pluripotencia fenntartásáért felelős gén (Pou5f1 (Oct-4), Nanog) azonosítása és jellemzése.
- (5) Egér és szarvasmarha embriók preimplantációs egyedfejlődésének vizsgálata a kisebb genom aktiváció és az EGA vonatkozásában.
- (6) Különböző HAT és HDAC enzimeket kódoló gének expressziós mintázatának meghatározása és mennyiségi jellemzése egér embriókban. Óriási előrelépést jelentene, ha a széles spektrumból ki lehetne választani azokat, amelyek aktívan szerepet játszanak a preimplantációs egyedfejlődés során lezajló újraprogramozás molekuláris folyamataiban, valamint az EGA alatt.

Alkalmazott módszerek

A kísérletek során a következő embrió módszereket alkalmaztuk:

- *in vivo* petesejtek kinyerése,
- *in vivo* embriók kinyerése,
- embriók *in vitro* tenyésztése,
- embriók mélyhűtése, felmelegítése,
- embriók szétválasztása blasztomer sejtekre,
- petesejtek parthenogenetikus aktiválása.

A petesejt és embrió mintákon az alábbi molekuláris biológiai módszerekkel végeztem a vizsgálatokat:

- totál RNS izolálás,
- mRNS izolálás,
- reverz transzkripció,
- polimeráz láncreakció,
- agaróz gél-elektroforézis,
- real-time polimeráz láncreakció,
- primer tervezés,
- kvantitatív PCR adatelemzés,
- génexpresszió stabilitás vizsgálat,
- egyéb alapvető molekuláris biológiai módszerek.

A fentiek közül a real-time polimeráz láncreakció, primer tervezés és kvantitatív PCR adatelemzés kiemelkedő fontosságú volt az egyedi embriókon alapuló génexpressziós protokoll és a különböző génexpressziós eredmények létrejöttében.

Tézisek

- 1(a)** A két RT-PCR módszer összehasonlításából kiderült, hogy a real-time RT-PCR több mint két nagyságrenddel érzékenyebb a végpont RT-PCR-nél, melyet a nagyobb mennyiségű kiindulási mintával, embriók egybegyűjtésével lehet valamiképpen ellensúlyozni. Az egyedi embriók, blasztomer sejtek génexpressziójának mennyiségi méréséhez azonban a real-time RT-PCR az alkalmasabb. A megbízhatóság, a reprodukálhatóság tekintetében szintén ez a módszer adott szignifikánsan jobb eredményt: CV = 19 % (real-time RT-PCR) és CV = 38 % (végpont RT-PCR).
- 1(b)** Ezt a real-time RT-PCR módszert sikerült tovább fejlesztenem egy teljes génexpressziós protokollá a petesejtek, embriók gyűjtésétől kezdve az RNS kinyerésén és átírásán keresztül a mennyiségi meghatározásig, illetve az adatok helyes kiértékeléséig, valamint jellemeztem a rendszer alkalmasságát, érzékenységét. A protokoll kidolgozása során a technikai hibák két fő összetevőjét határoztam meg: a PCR a teljes hiba nagy részét képezte és hasonló arányban járult hozzá az mRNS izolálás is, míg az RT lépésnek nem volt számottevő szerepe. A teljes hibát a 6-6 embrió mintában mért relatív szóráshoz viszonyítva megállapítható, hogy az egyedek közt kimutatható különbségek lényegesen nagyobbak a teljes protokoll technikai hibájánál, vagyis a mért eltérések valóban a köztük lévő biológiai különbségekből eredtek, nem a mérési hibák összességéből. Ilyen összehasonlítást eddig az irodalomban nem írtak le, ezt először állapítottam meg. Hangsúlyozni kell azonban, hogy az ezzel a qRT-PCR módszerrel nyert adatok is csupán pillanatfelvételek arról, hogy az adott mRNS-ből mennyi található az adott időpontban, az adott sejten, embrióban, vagy szöveti mintában.
- 1(c)** A protokoll ellenőrzése során jelentős egyedi különbségeket tudtam kimutatni a négysejtes egér embriók blasztomer sejtjei között a Nanog és Pou5f1 expressziójában, valamint a nyolcsejtes embrióknál a Nanog expressziójában. Amennyiben következetesen tapasztalható a specifikus gének expressziós különbsége a blasztomer sejtek között, feltehető, hogy ezek a sejtek egy bizonyos fejlődési irányban való elköteleződésének nagyon korai jelei.
- 2(a)** A mélyhűtés hatására előidézett molekuláris változások ismeretének hiányosságait tártam fel különböző stádiumú egér embriókban két különböző vitrifikációs módszer összehasonlításával (SSV és ISV). Az ISV módszernél az egysejtes embriókban megemelkedett expressziós aktivitást tapasztaltam a különböző stressz válaszban szerepet játszó vizsgált géneknél a fellelegítést követően 3 órával. Ezek a különbségek eltűntek 10 órára, valamint később a hólyagcsíra állapotban. Érdekessége, hogy az eljárás képes volt már az EGA előtt is gyors, kiugró génexpressziót indukálni, mely aztán hamar lecsengett. Ezek a változások korai jelei lehetnek az ISV-n átesett embriók csökkent életképességének.
- 2(b)** A nyolcsejtes embriók esetében nem találtam ilyen egyértelmű összefüggéseket. Ennek okai lehetnek, hogy a 8 blasztomer sejt sokkal összetettebb rendszert képez, melyben az egyedi sejtek is eltérően reagálhatnak, kiegyenlítve egymás expressziós aktivitását, és hogy ilyenkor már az embrionális genom teljes aktivitással működik. Több gén bevonásával, esetleg az egyedi sejtek vizsgálatával tovább lehet

finomítani az eredményeket. Az SSV embriók morfológiailag nem különböztek a kontrollhoz képest, a génexpresszióban mégis észleltem finom különbségeket. Összehasonlítva a két mélyhűtési módszert az SSV hatására kevésbé változott a különböző stressz gének expressziója és a morfológiai, életképességbeli megfigyelések alapján is ez bizonyult hatékonyabbnak.

2(c) A referenciának választott háztartási gén (Actb) mérési eredménye arra mutat, hogy az ISV hatással volt az expressziójára. Elképzelhető, hogy közvetve kihatott a gén szintű reakcióra is a nagy mennyiségben alkalmazott krioprotektáns anyag a sejtek vázszerkezetének befolyásával. Ebből levonható a következtetés, miszerint az Actb gén nem megfelelő referencia az embrió mélyhűtési vizsgálatokban, és több más háztartási gén vizsgálata is szükséges a legalkalmasabb(ak) kiválasztásához.

3(a) Érdekes, eddig nem vizsgált megfigyelést tettem, miszerint a korai és késői kétsejtes stádiumok között, az EGA során a legtöbb háztartási gén aktivitása is jelentősen változik az egér embrióban. E mögött az a jelenség áll, hogy az anyai RNS-eket felváltják az embrió genomjáról átíródó RNS-ek. Különösen fontos ezért a két stádium elkülönített vizsgálata, hogy az ilyenkor is stabil referencia géneket ki lehessen választani.

3(b) A parthenogenetikus aktiválás nem váltott ki nagy hatást a különböző háztartási gének expressziójára a korai egyedfejlődés során. A nyolcsejtes állapotban szinte azonos mintázatot mutatott, mint az *in vivo* embrióké, ugyanakkor az *in vitro* tenyésztés önmagában is magasabb expressziót eredményezett. Elsőként írtam le a parthenogenetikusan aktivált embriók génexpressziójának vizsgálatát. Az aktiváció a testi sejtis klónozási eljárásnak is fontos része, így az eredmények megfelelő kontrollként szolgálhatnak a későbbiekben.

3(c) A vizsgálat alapján sikerült kiválasztani három olyan stabilan expresszáló referencia gént (H2afz, Hprt1 és Ppia), amelyek viszonylag állandó szinten fejeződnek ki a különböző stádiumokban, beleértve a korai és késői kétsejtes állapotokat is, valamint az *in vivo*, *in vitro* és parthenogenetikusan aktivált embriókban. Nagy előnye a megbízhatóságot tekintve, hogy egyedi embriókban mértem a gének expresszióját. A három legstabilabb gén expressziós értékei alapján kiszámoltam azokat a normalizációs faktor értékeket, melyekkel elvégezhető a vizsgált gének normalizálása. Fontos hangsúlyozni, hogy ezeket az értékeket csak abban az esetben lehet felhasználni a kiértékelésekben, ha ugyanezeket a módszereket, protokollt, ugyanezen embrió stádiumokat és tenyésztési körülményeket alkalmazzák. A gyakran referenciának használt Actb gén mutatkozott a legkevésbé stabilnak, melyet alátámaszt a korábban leírt mélyhűtési kísérletben tapasztalt expressziós változás is.

4(a) A korábban egérben elvégzett referencia gének kiválasztásának mintájára a nyúlban is hasonlóképpen jártam el. Ezidáig ilyen vizsgálatot - egyszerre 10 referencia gén, 7 stádiumon, *in vivo* és *in vitro* egyedi embriókban - nem végeztek el annak ellenére, hogy a normalizáláshoz megfelelő referencia génekre nagy szükség van. Az egérnél megfigyelt jelenséget itt is tapasztaltam, mely szerint több háztartási gén a legalacsonyabb expressziót az EGA alatt mutatta, vagyis a nyolcsejtes állapotban, ezért itt a korai és késői nyolcsejtes stádiumok különválasztása volt indokolt.

- 4(b)** A két tenyésztési csoportban mért génexpressziós stabilitási értékek hasonlósága alapján feltehető, hogy az *in vitro* körülmények nagyon jól közelítik az *in vivo* állapotot, illetve a nyúl embriók kevésbé érzékenyek az *in vitro* tenyésztési eltérésekre a háztartási gének expressziójának vonatkozásában. Érdekes eredményt adott az Actb gén, mely az *in vivo* mintákban stabil volt, ellenben az *in vitro* mintákban az egyik legkevésbé stabilnak mutatkozott. Ez ismét felveti, hogy mint azt korábban az egérnél is tapasztaltam, az Actb gén a nyúlban sem alkalmas referenciának a különböző kezelések során. Biológiai okainak kiderítését a jövőben tervezem. A három választott referencia gén (H2afz, Hprt1 és Ywhaz) mért expressziós értékeiből kiszámolhatók a normalizációs faktor értékek, melyek általánosan felhasználhatók a jövőben nyúlön végzendő génexpressziós vizsgálatokban.
- 4(c)** Munkám során sikerült először azonosítani a két gént (Pou5f1 és Nanog) nyúlban, majd meghatározni a Pou5f1 gén expressziójának szövet és fejlődési stádium specifikus mintázatát. Az embriókban kapott eredményből látszik, hogy a petesejtből származó mRNS mennyisége lecsökkent a nyolcsejtes állapotra és az ekkor lezajló EGA alatt maradt a legalacsonyabb szinten, majd már az embrió genomjáról szintetizálódva újra emelkedett. Időközben az emberi genom projekt kiterjesztése más fajokra, többek között a nyúlra is, felgyorsította a nyúlön, mint modellállaton végzett kutatások ütemét és leírták a Pou5f1 teljes szekvenciáját is a nyúl genom szekvenálás eredményeként. Az általam leírt szekvencia összehasonlításakor teljes egyezést mutatott vele, mely megerősítette a Pou5f1 gén azonosítását. A Nanog szekvenciánál egérben és emberben nemrég leírt pszeudogének jelenlétéből eredő ellentmondások miatt a további vizsgálatokat felfüggesztettem.
- 5** A szarvasmarhában leírt, választott gének expressziós mintázata jól követte a várt kisebb genom aktiváció és EGA eseményeit. Ugyanez az egérben kevésbé volt szembetűnő. Ennek egyik magyarázata lehet, hogy a kiválasztott gének fajspecifikus expressziós különbségeit sikerült kimutatni. Másrésről az egér esetében nehezebb szétválasztani a két genom aktivációt, mivel az EGA korán, már a kétsejtes állapotban lezajlik, így az egysejtes állapotban lehet csak a kisebb genom aktivációt kimutatni. Itt további, különböző időpontokban kinyert egysejtes embriókat is bevontam a vizsgálatba, melyek mérése és kiértékelése jelenleg még folyik.
- 6** Először sikerült részletesen meghatározni az összes eddig ismert HDAC és néhány fontosabb HAT gén együttes expressziós mintázatát az egér preimplantációs egyedfejlődése alatt, különös hangsúllyal az EGA-ra. Az eredmények érdekessége, hogy szinte mindegyik gén aktívan jelen volt már a petesejtben is, és a különböző gének jellegzetes expressziós mintázatokat mutattak. Különösen a HDAC gének közül többnek az expressziója is fokozódott a kisebb genom aktivációban, másik részüknek pedig csak az EGA alatt volt magas az expressziós szintje. Ez arra enged következtetni, hogy a különböző HDAC gének jól szabályozottan, egymást váltva töltik be funkciójukat a preimplantációs egyedfejlődés során. Elképzelhető, hogy funkcionálisan gén fölösleg (redundancia) áll fenn, vagyis az egyik gén működésének meghibásodása esetén a többi képes ellensúlyozni annak speciális szerepét. Ugyanakkor a HAT gének legtöbbször az mRNS-e már a petesejtben felhalmozva jelen volt, mely később a fejlődés alatt lecsökkent kivéve kettőt, melyek az EGA alatt szintén magas expressziós szintet mutattak.

Következtetések

- (1) A kidolgozott mennyiségi génexpressziós protokoll az egyedi embriók között kimutatott biológiai különbségeknél jóval alacsonyabb technikai hibája révén alkalmas egyedi sejtekből, embriókból egyszerre 10-15 gén mRNS szintjének meghatározására is. Alkalmazásával lehetővé válik a biológiai különbségek okainak felismerése, a génexpresszió finomabb különbségeinek felfedése és az eredmények pontosabb statisztikai elemzése. A négy- és nyolcsejtes egér embriók blasztomer sejtei között jelentős expressziós különbségeket mutattam ki, melyek a bizonyos fejlődési irányban való elköteleződésük korai jelei lehetnek.
- (2) A két mélyhűtési módszer összehasonlításából kiderült, hogy az SSV sokkal hatékonyabb, mint az ISV. A vizsgált gének expressziós változásait sikerült összefüggésbe hozni az egér embriók morfológiai, és életképességben tapasztalt eltéréseivel. Az egyéni embriók szintjén történő real-time RT-PCR módszer új lehetőséget nyújt a mélyhűtés okozta molekuláris események megértéséhez, olyan kulcsfontosságú marker gének azonosításához, melyek a mélyhűtési módszerek további fejlesztését segítik.
- (3) Kimutattam, hogy az *in vitro* tenyésztésnek és a parthenogenetikussá aktiválásnak jelentős hatása van a háztartási gének expressziójára a preimplantációs egyedfejlődés során, vagyis alapos körütekintéssel kell meghatározni minden kísérlet előtt a normalizáláshoz alkalmazott legstabilabb referencia géneket a félvezető következtetések levonásának elkerülése érdekében. Az egér embriók esetében egységesen a H2afz, Hp1t1 és Ppia géneket találtam alkalmasnak a különböző preimplantációs stádiumokban.
- (4) A nyúl embriókban a H2afz, Hp1t1 és Ywhaz génekről sikerült igazolni, hogy expressziójuk a legstabilabb a korai egyedfejlődés alatt az *in vivo* és *in vitro* mintákban. Azonosítottam a Pou5f1 (Oct-4) transzkripciós faktort a nyúlban és igazoltam, hogy jelen van a preimplantációs egyedfejlődése során hasonlóan más emlős fajokhoz.
- (5) A szarvasmarhában és az egérben jelentős és feltehetőleg fajspecifikus génexpressziós különbségeket sikerült kimutatni az EGA-hoz kapcsoltnak, mely mutatja az egér, mint modell állat korlátait. A különböző fajokból nyert génexpressziós mintázatok összehasonlításából következtetni lehet a molekuláris szintű újraprogramozódás folyamatainak eltéréseire, azok konzervált voltára, valamint az evolúciós változásokra is.
- (6) A preimplantációs egyedfejlődés alatt több HDAC és HAT gén együttes expresszióját mutattam ki egérben, mely arra világít rá, hogy nem csak egy-egy gén felelős az újraprogramozódásért és az EGA-ért, hanem feltehetőleg közösen, egymást kiegészítve töltik be a szerepüket. A folyamat részletes megértéséhez még további átfogó vizsgálatok szükségesek.

Összegzésül: A kutatócsoport általános céljaihoz sikerült megteremtenem a molekuláris biológiai háttér és információt nyerni a génexpressziós eszközrendszer segítségével több, az embrió technológiákat támogató vizsgálatban. A munkám során elvégzett kísérletek eredményei igazolják a felállított rendszer alapelveinek helyességét a többváltozós elemzésekre és bizonyítékát adják a széles spektrumú alkalmazhatóságának. Nyilvánvaló azonban, hogy még jelentős erőfeszítést igényel az emlősök egyedfejlődésében szerepet játszó epigenetikai folyamatoknak, a betegségekben megnyilvánuló zavaroknak a megismerése, és mesterséges befolyásolása.

Tudományos publikációk

A doktori értekezés alapjául szolgáló közlemények

Gal AB, Carnwath JW, Dinnyes A, Herrmann D, Niemann H, Wrenzycki C. (2006) Comparison of real-time polymerase chain reaction and end-point polymerase chain reaction for the analysis of gene expression in preimplantation embryos.

Reprod Fertil Dev.; **18**(3): 365-371.

IF: 1,086 (2003.); 2,541 (2006.)

Boonkusol D, Gal AB, Bodo S, Gorhony B, Kitiyanant Y, Dinnyes A. (2006) Gene expression profiles and in vitro development following vitrification of pronuclear and 8-cell stage mouse embryos.

Mol Reprod Dev.; **73**(6): 700-708.

IF: 2,543 (2003.); 2,379 (2006.)

Mamo S, Baji Gal A, Bodo S, Dinnyes A. (2007) Quantitative evaluation and selection of reference genes in mouse oocytes and embryos cultured in vivo and in vitro.

BMC Dev Biol.; **7**: 14.

IF: - (2003.); IF: 3,5 (2006.)

További közlemények

Baji Gál Árpád, Bodó Szilárd, Boonkusol Duangjai, Görhöny Botond, Balogh Emese, Dinnyés András (2005) Génextpressziós különbségek kimutatása kinetikus PCR-rel korai egér embriók egyedi blasztomer sejtjeiben. *Állattenyésztés és Takarmányozás.*; **54**(3): 285-292.

Á. Baji Gál, Sz. Bodo, A. Dinnyes (2005) Epigenetic code changes during early mouse embryo development - focus on histone deacetylation. (30th FEBS Congress - 9th IUBMB Conference, July 2-7 2005, Budapest) *FEBS J.*; **272**(s1): O1-052P.

Táncos Zsuzsanna, Kobolák Julianna, Baji Gál Árpád, Dinnyés András (2006) Az oct-4 és nanog transzkripció faktor gének azonosítása preimplantációs korú nyúl embriókban. *Állattenyésztés és Takarmányozás.*; **55**(6): 577-589.

A. Baji Gal, S. Mamo, S. Bodo, A. Dinnyes (2007) Comparison of housekeeping gene expression in individual 8-cell stage mouse embryos produced under different conditions. (43rd Annual Conference of the International Embryo Transfer Society, Jan 6-10 2007, Caribe Royale, Orlando, Japan) *Reprod Fertil Dev.*; **19**(1): 246-247.

S. Mamo, A. Baji Gal, Z. Polgar, A. Dinnyes (2008) Expression profiles of the pluripotency marker POU5F1 and validation of reference genes in rabbit oocytes and preimplantation stage embryos. *BMC Mol Biol.*; benyújtva

K. Kiss, J. Kobolák, Z. Táncos, S. Mamo, Z. Polgar, C. Rogel-Gaillard, A. Baji Gal, A. Dinnyes (2008) Promoter analysis of the rabbit pou5f1 gene and its expression in preimplantation stage embryos. *Mol Reprod Dev.*; benyújtva

Köszönetnyilvánítás

Szeretném mindenkinek megköszönni a segítséget a doktori munkám megvalósításában, név szerint:

Lennert Lídiának (feleségemnek)

Baji Gál Lídiának, Valériának és Árpádnak (gyerekeimnek)

Dr. Dinnyés Andrásnak (vezetőmnek)

Prof. Gráf Lászlónak, és az ELTE Biokémia Tanszékének

Dr. Adorján Mártának

Dr. Balogh Emesének

Bara Sándornénak

Vladimir Benesnek

Dr. Bodó Szilárdnak

Duangjai Boonkusolnak

Stephen A. Bustinnak

Joseph W. Carnwathnak

Deák Editnek

Dr. Görhöny Botondnak

Jiri Kankának

Mikael Kubistának

Kungl Györgyinek

Dr. Solomon Mamonak

Lucie Nemcovának

Tania Nolannak

Polgár Zsuzsannának

Táncos Zsuzsannának

valamint

a „B.E.Sz.T.”-nek

Klotz Istvánnénak, Wittmayer Zsuzsannának, Bálint Miklósnak (volt tanárainknak)

Olasz Ferencnek, Csomor Katalinnak, Dr. Thaler Györgynek (volt vezetőimnek).